



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97663** (13) **C2**

(51) МПК (2012.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61K 31/702** (2006.01)

**A61P 1/00**

**A61P 37/04** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
| (21) Номер заявки:  | <b>а 2009 10897</b>                      | (72) Винахідник(и):                                      | <b>Хубер-Хааг Карл-Йозеф (СН),<br/>Фішот Марі-Клер (СН),<br/>Рошат Флоренс (СН),<br/>Спренгер Норберт (СН)</b>  |
| (22) Дата подання заявки:   | <b>27.03.2008</b>                        | (73) Власник(и):   | <b>НЕСТЕК С.А.,<br/>Avenue Nestle 55, CH-1800 Vevey,<br/>Switzerland (CH)</b>   |
| (24) Дата, з якої є чинними<br>права на винахід:  | <b>12.03.2012</b>                        | (74) Представник:  | <b>Авраменко Наталія Василівна, реєстр.<br/>№34</b>   |
| (31) Номер попередньої<br>заявки відповідно до<br>Паризької конвенції:                        | <b>07105074.4</b>                        | (56) Перелік документів, взятих до уваги<br>експертизою: | <b>WO 2006108824 A, 19.10.2006.<br/>us 2003129278 A1, 10.07.2003.<br/>Salvini f et al: "Probiotics, prebiotics and child<br/>health: where are we going?" Journal of<br/>International Medical Research, Cambridge<br/>Medical Publications Ltd, GB, Vol. 32, no. 2,<br/>01.03.2004, - P. 97-108.</b> |
| (32) Дата подання<br>попередньої заявки<br>відповідно до<br>Паризької конвенції:              | <b>28.03.2007</b>                        |  |   |
| (33) Код держави-учасниці<br>Паризької конвенції,<br>до якої подано<br>попередню заявку:      | <b>EP</b>                                |  |   |
| (41) Публікація відомостей<br>про заявку:   | <b>25.11.2009, Бюл.№ 22</b>              |  |   |
| (46) Публікація відомостей<br>про видачу патенту:   | <b>12.03.2012, Бюл.№ 5</b>               |  |   |
| (86) Номер та дата<br>подання міжнародної<br>заявки, поданої<br>відповідно до<br>Договору РСТ | <b>РСТ/EP2008/053611,<br/>27.03.2008</b> |  |   |

## (54) ЗАСТОСУВАННЯ BIFIDOBACTERIUM LACTIS CNCM I-3446 ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ КИШКОВОЇ МІКРОБІОТИ У ДІТЕЙ, НАРОДЖЕНИХ ШЛЯХОМ КЕСАРЕВА РОЗТИНУ

### (57) Реферат:

Застосування Bifidobacterium lactis CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції як стимулятора розвитку початкової біфідогенної кишкової мікробіоти або як засобу для зниження ризику подальшого розвитку алергії, або як засобу для попередження або лікування діареї у дітей, народжених шляхом кесарева розтину. Додатково може містити суміш олігосахаридів.

UA 97663 C2



Даний винахід відноситься до введення грудним дітям, народженим шляхом кесарева розтину, специфічного пробіотичного штаму бактерій, здатного стимулювати розвиток початкової біфідогенної мікробіоти кишечника.

Вважається, що безпосередньо перед пологами шлунково-кишковий тракт дитини є стерильним. В процесі природних пологів він контактує з бактеріями травного тракту, шкіри матері і навколишнього її середовища і починає колонізуватися. У фекальній мікробіоті здорової вагінально-народженої, вигодовуваної грудьми дитини у віці від 2 до 4 тижнів, яку можна прийняти за оптимальну мікробіоту для вказаної вікової групи, домінують види біфідобактерій з деякими видами лактобацил і незначними кількостями бактероїдів, таких як *Bacteriodes fragilis*, за винятком потенційних патогенів, таких як клостридії. Після закінчення періоду відняття від грудей у віці приблизно 2 років встановлюється склад кишкової мікробіоти, схожий з складом кишкової мікробіоти дорослої людини.

Слід відмітити, що у здорової, вагінально-народженої, вигодовуваної грудьми дитини біфідобактерії формують основу мікробіоти, налічуючи від 60 % до 90 % загальної кількості бактерій в кишечнику немовляти. Грудне вигодовування сприяє також розвитку захисного кишкового бар'єру, що в умовах домінування біфідобактерій приводить до поліпшення всмоктування і, отже, утилізації споживаних харчових речовин.

Grönlund et al. вивчали фекальну мікробіоту здорових дітей, народжених шляхом кесарева розтину, і порівнювали її з фекальною мікробіотою відповідної за віком групи вагінально-народжених дітей. Вони прийшли до висновку, що кишкова флора дітей, народжених шляхом кесарева розтину, може змінюватися в період до шести місяців після народження. Вони особливо відзначили, що швидкість колонізації кишківника біфідобактеріями і лактобацилами в групі дітей, народжених шляхом кесарева розтину, досягала швидкості колонізації кишківника в групі вагінально-народжених дітей лише через один місяць і 10 днів, відповідно (Grönlund et al., "Fecal Microflora in Healthy Infants Born by Different Methods of Delivery: Permanent Changes in Intestinal Flora After Cesarean Delivery", *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 28: 19-25).

Інші дослідники висловили припущення, що ця сповільнена/аберрантна колонізація може мати специфічні наслідки в рамках подальшого розвитку немовляти, і що існує можливий зв'язок між цими наслідками і відмінностями в кишковій мікробіоті. Наприклад, Laubereau et al. встановили, що діти, народжені шляхом кесарева розтину, відносяться до групи підвищеного ризику розвитку діареї в порівнянні з вагінально-народженими дітьми. (Laubereau et al., "Caesarean Section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis and sensitisation during the first year of life", *Arch. Dis. Child* 2004, 89: 993-997). Negele et al. встановили, що пологи з допомогою кесарева розтину можуть бути додатковим чинником ризику проявів ускладненого дихання і підвищеної чутливості до харчових алергенів у віці до двох років (Negele et al. "Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life", *Pediatr. Allergy Immunol.* 2004, 15: 48-54). Висловлювалося також припущення, що систематичні незначні запалення і субоптимальна кишкова мікробіота також можуть призводити до розвитку ожиріння (Fantuzzi G. "Adipose tissue, adipokines, and inflammation", *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115: 911-919; Backhed F., Ding H., Wang T., et al. "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101: 15718-15723).

Вигодовування материнським молоком рекомендується для всіх грудних дітей. Проте в деяких випадках грудне вигодовування є недостатнім або безуспішним за медичними показниками або сама мати відмовляється годувати грудьми. Для таких ситуацій розроблені суміші для дитячого харчування.

Останнім часом певні штами бактерій викликали підвищений інтерес, що пояснюється тим, що при попаданні в організм людини вони проявляють, як було встановлено, цінні для його здоров'я властивості. Зокрема, було встановлено, що специфічні штами роду *Lactobacilli* і роду *Bifidobacteria* здатні колонізувати кишечник, знижувати здібність патогенних бактерій до прилипання до кишкового епітелію, викликати імунomodуючий ефект і полегшувати підтримку хорошого самопочуття. Такі бактерії іноді називають пробіотиками, і вже запропоновано додавати відповідні пробіотичні бактерії в суміші для дитячого харчування.

Проведені екстенсивні дослідження по ідентифікації нових пробіотичних штамів, наприклад, в EP 0199535, EP 0768375, WO 97/00078, EP 0577903 і WO 00/53200 розкриваються специфічні штами лактобацил і біфідобактерій і їх корисна для здоров'я дія.

Зовсім нещодавно почало виявлятися деяке турбування у зв'язку із додаванням пробіотичних бактерій до суміші для харчування немовлят, що є єдиним джерелом харчування для немовлят у перші шість місяців життя. Ці побоювання були узагальнені в медичному меморандумі Комітета по харчуванню ESPGHAN (Європейське товариство педіатричної

гастроентерології, гепатології і харчування), що зветься "Пробіотичні бактерії в дієтичних продуктах для немовлят" ("Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants", Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, 38: 365-374).

Кишкова мікробіота грає важливу роль в гідролізі важко переварюваних олігосахаридів і полісахаридів до легко всмоктуваних моносахаридів і в активації ліпопротеїн-ліпази шляхом прямої дії на ворсинчастий епітелій. Крім того, недавно було доведено, що жіноче молоко містить не тільки олігосахариди, але і біфідобактерії. В той же час, дослідження по вивченню генома переконливо показали, що біфідобактерії, присутні в кишечнику вигодовуваних грудьми дітей, такі як *Bifidobacterium longum*, спеціально призначені для засвоєння олігосахаридів жіночого молока як нутрієнтів. *Bifidobacterium longum* адаптовані також до умов середовища в товстій кишці, де відбувається накопичення енергії з вуглеводів, що всмоктуються повільніше.

Одним словом, з'являється все більше і більше доказів того, що встановлення необхідної кишкової мікробіоти в ранні періоди життя може бути суттєвим для подальшого розвитку здорового організму. В той же час, кількість пологів за допомогою кесарева розтину продовжує зростати, досягаючи в деяких країнах 70 % загальної кількості пологів. Звідси зрозуміло, що існує необхідність забезпечення засобів для стимулювання швидкого становлення необхідної кишкової мікробіоти у грудних дітей в тих випадках, коли цього неможливо досягти природним шляхом. Ця необхідність особливо назріла в даний час, коли, відповідно до сталої практики, вагітним жінкам, для яких заплановано пологи із кесаревим розтином, призначають профілактичні дози антибіотиків.

Як зазначалося вище, у здорової, вагінально народженої, вигодовуваної грудьми дитини бактерії роду *Bifidobacteria* утворюють основу мікробіоти, що становить 60-90 % загальної кількості бактерій у кишківнику дитини. Види біфідобактерій, що переважно встановлюють у таких немовлят, відносяться до *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* і *Bifidobacterium longum*. Авторами даного винаходу несподівано було встановлено, що введення грудним дітям, народженим шляхом кесарева розтину, специфічного штаму різних видів біфідобактерій, а саме - *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446, сприяє розвитку у них початкової біфідогенної кишкової мікробіоти.

Таким чином, даний винахід розкриває застосування *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції для стимуляції розвитку початкової біфідогенної кишкової мікробіоти у грудних дітей, народжених шляхом кесарева розтину.

Винахід далі розкриває застосування *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції для зниження ризику подальшого розвитку алергії у грудних дітей, народжених шляхом кесарева розтину.

У наступному аспекті винахід розкриває застосування *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції для попередження або лікування діареї у грудних дітей, народжених шляхом кесарева розтину.

Винахід також описує спосіб стимуляції розвитку початкової біфідогенної кишкової мікробіоти у грудних дітей, народжених шляхом кесарева розтину, який передбачає введення терапевтичної дози *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 немовляті, народженому шляхом кесарева розтину, що потребує цього.

Винахід описує також спосіб зниження ризику подальшого розвитку алергії у немовляти, народженого шляхом кесарева розтину, за рахунок введення терапевтичної дози *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 немовляті, народженому шляхом кесарева розтину, що потребує цього.

Винахід поширюється також на спосіб попередження або лікування діареї у немовляти, народженого шляхом кесарева розтину, за рахунок введення терапевтичної дози *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 немовляті, народженому шляхом кесарева розтину, що потребує цього.

Не бажаючи зупинятися на теорії, автори даного винаходу вважають, що отримання *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 новонародженою дитиною, що народжена шляхом кесарева розтину, сприятиме в деякій мірі, якщо не повною мірою, подальшій колонізації шлунково-кишкового тракту такої дитини тими видами біфідобактерій, які зазвичай присутні в шлунково-кишковому тракті здорових, вагінально-народжених дітей. Вважається, що така колонізація корисних бактерій сприяє зниженню ризику частих випадків діареї, до яких, як було показано, схильні грудні діти, народжені шляхом кесарева розтину. Передбачається також, що колонізація корисних бактерій допоможе знизити ризик подальшого розвитку алергії, що виявляється, наприклад, у формі ускладненого "свистячого" дихання і/або підвищеної чутливості до харчових алергенів.

Слід зазначити, що метою і ефектом такого лікування є стимулювання колонізації кишечника не тільки самим штамом *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446, але і стимулювання колонізації

іншими видами з тим, щоб забезпечити становлення початкової біфідогенної кишкової мікробіоти, порівняної з кишковою мікробіотою здорових, вигодовуваних грудьми, вагінально-народжених дітей.

Короткий опис фігур

5 Фіг.1 показує кількість *B. breve* and *B. longum* в зразках фекалій і у вмісті тонкої кишки гнотобіологічних (стерильних) мишей, яким примусово вводилася мікробіота немовляти, на 14 день лікування.

Фіг.2 показує кількість *C. perfringens* в зразках вмісту тонкої кишки і фекалій гнотобіологічних мишей, яким примусово вводилася мікробіота немовляти, на 14 день лікування.

10 Уданому описі нижченаведені терміни мають наступні значення:

"початкова біфідогенна кишкова мікробіота" означає кишкову мікробіоту немовляти у віці до 12 місяців, в якій домінують біфідобактерії, такі як *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium longum*, за винятком популяцій таких видів, як клостридії і стрептококи, і яка в більшості випадків порівнянна з кишковою мікробіотою вагінально-народженої, вигодовуваної грудьми дитини такого ж віку;

"немовля" відноситься до дитини у віці до 12 місяців;

"пребіотик" означає неперетравлюваний харчовий інгредієнт, який позитивно впливає на особу, вибірково стимулюючи зростання і/або активність одного або певної кількості видів бактерій в товстій кишці і покращуючи, тим самим, здоров'я особи (Gibson and Roberfroid "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics", J. Nutr. 125: 1401-1412);

"пробіотик" означає препарати мікробних клітин або компоненти мікробних клітин, що мають сприятливий ефект для здоров'я або самопочуття особи (Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. et al. "Probiotics: how should they be defined", Trends Food Sci. Technol. 1999, 10: 107-110).

25 Всі посилання на величину процентів означають зміст в мас. %, якщо не зазначено інше.

*Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 реалізується на ринку *inter alia* (серед іншого) компанією Christian Hansen (Данія) під торговою маркою Bb12. Відповідна добова доза складає від  $10^5$  до  $10^{11}$  КУО, переважніше - від  $10^7$  до  $10^{10}$  КУО.

30 Переважно *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 вводиться разом з пребіотиком. Придатні для даної мети пребіотики включають деякі олігосахариди, такі як фруктоолігосахариди (FOS) і галактоолігосахариди (GOS). Може використовуватися комбінація пребіотиків, наприклад, комбінація з 90 % GOS з 10 % коротколанцюгових фруктоолігосахаридів, така, як продукт, що реалізовується на ринку під торговою маркою Beneo® P95, або з 10 % інуліна, така, як продукт, що реалізовується на ринку під торговою маркою Beneo® HP, ST або HSI.

35 Особливо переважним пребіотиком є суміш олігосахаридів, яка містить від 5 % до 70 мас. %, принаймні, одного N-ацетильованого олігосахариду, обраного з групи, що включає GalNAcα1,3Galβ1,4Glc і Galβ1,6GalNAcα1,3Galβ1,4Glc; від 20 % до 90 мас. % принаймні одного нейтрального олігосахариду, вибраного з групи, що включає Galβ1,6Gal, Galβ1,6Galβ1,4Glc Galβ1,6Galβ1,6Glc, Galβ1,3Galβ1,3Glc, Galβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,6Galβ1,4Glc, Galβ1,6Galβ1,3Galβ1,4Glc Galβ1,3Galβ1,6Galβ1,4Glc і Galβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Glc, і від 5% до 50 мас. % принаймні одного сіалійованого олігосахариду, вибраного з групи, що включає NeuAcα2,3Galβ1,4Glc і NeuAcα2,6Galβ1,4Glc. Така суміш олігосахаридів детальніше описана в WO 2007/090894, зміст якої включений в перелік посилань, прийнятих до уваги при складанні даної заявки; така суміш олігосахаридів далі по тексту названа "вищеописаною сумішшю олігосахаридів".

45 Переважно вищеописана суміш олігосахаридів містить від 10 % до 70 мас. % вищезгаданого N-ацетильованого олігосахариду(ів), від 20 % до 80 мас. % вищезгаданого нейтрального олігосахариду(ів) і від 10 % до 50 мас. % вищезгаданого сіалійованого олігосахариду(ів). Переважніше суміш містить від 15 % до 40 мас. % N-ацетильованого олігосахариду(ів), від 40 % до 60 мас. % іншого нейтрального олігосахариду(ів) і від 15 % до 30 мас. % сіалійованого олігосахариду(ів). Особливо переважною сумішшю є суміш з 30 мас. % N-ацетильованого олігосахариду(ів), 50 мас. % нейтрального олігосахариду(ів) і 20 мас. % сіалійованого олігосахариду(ів).

55 Альтернативно вищеописана суміш олігосахаридів може відповідно містити від 5 % до 20 мас. % вищезгаданого N-ацетильованого олігосахариду(ов), від 60 % до 90 мас. % вищезгаданого нейтрального олігосахариду(ів) і від 5 % до 30 мас. % вищезгаданого сіалійованого олігосахарид(ів).

60 Вищеописана суміш олігосахаридів може бути приготована з молока одного або більше видів тварин. Молоко може бути отримане від будь-якого ссавця, зокрема, від корів, кіз, буйволів, коней, слонів, верблюдів або овець.

Альтернативно вищеописана суміш олігосахаридів може бути приготована змішуванням окремих компонентів, придбаних на ринку. Наприклад, синтезовані галактоолігосахаріди, такі як Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc і Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, і їх суміші реалізуються на ринку під товарними знаками Vivinal® и Elix'or®. Іншими постачальниками олігосахаридів є Dextra Laboratories, Sigma-Aldrich Chemie GMBH і Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Альтернативно для отримання нейтральних олігосахаридів можуть використовуватися специфічні глікозилтрансферази, такі як галактозилтрансферази.

N-ацетильовані олігосахариди можуть бути отримані в процесі дії глюкозамінідази і/або галактозамінідази на N-ацетил-глюкозу і/або N-ацетил-галактозу. Аналогічним чином для цієї мети можуть використовуватися N-ацетил-галактозилтрансферази і/або N-ацетил-глікозилтрансферази. N-ацетильовані олігосахариди можуть бути отримані також за технологією ферментації із застосуванням відповідних ферментів (рекомбінантних або природних) і/або мікробної ферментації. У останньому випадку мікроорганізми можуть виділяти свої природні ферменти і субстрати, або можуть рекомбінуватися з метою подальшого отримання відповідних субстратів і ферментів. Можуть використовуватися культури одного виду мікроорганізмів або змішані культури. Утворення N-ацетильованого олігосахариду може ініціюватися акцепторними субстратами, починаючи з будь-якого ступеня полімеризації (DP) - від DP=1 і вище. Іншим методом є хімічна конверсія кетогексоз (наприклад, фруктози), як вільних, так і пов'язаних з олігосахаридом (наприклад, з лактулозою), в N-ацетилгексозамін або в N-ацетилгексозамін, що містить олігосахарид, як описано в Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38: 827-828.

Сіалійовані олігосахариди - 3'-сіалил-лактоза і 6'-сіалил-лактоза - можуть бути виділені технікою хроматографії або фільтрації з природного джерела, такого як молоко тварин. Альтернативно, вони можуть бути також отримані за допомогою біотехнологій, в яких застосовуються специфічні сіалилтрансферази або за допомогою технології ферментації (ферменти можуть бути рекомбінантними або природними), або за допомогою технології мікробної ферментації. У останньому випадку мікроорганізми можуть виділяти свої природні ферменти і субстрати або можуть рекомбінуватися з метою подальшого продукування ними відповідних субстратів і ферментів. Можуть використовуватися культури одного виду мікроорганізмів або змішані культури. Утворення сіалійованого олігосахариду може ініціюватися акцепторними субстратами, починаючи з будь-якого ступеня полімеризації (DP) - від DP=1 і вище.

Разом з *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 можуть вводитися і інші пробіотичні бактерії. Для цієї мети можуть використовуватися будь-які молочнокислі бактерії або біфідобактерії зі встановленими пробіотичними характеристиками. Відповідні пробіотичні молочнокислі бактерії включають *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 від, зокрема, (inter alia) Valio Oy (Фінляндія) під торговою маркою LGG; *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 від Biogaia або *Lactobacillus paracasei* CNCM 1-2116.

Відповідні інші пробіотичні штами біфідобактерій включають штам *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, що реалізовується на ринку фірмою Morinaga Milk Industry Co. Ltd. (Японія) під торговою маркою BB536; штам *Bifidobacterium breve*, що реалізовується на ринку фірмою Danisco під торговою маркою Bb-03; штам *Bifidobacterium breve*, що реалізовується на ринку фірмою Morinaga під торговою маркою M-16V, і штам *Bifidobacterium breve*, що реалізовується на ринку Інститутом Роселла (Institut Rosell, Німеччина) під торговою маркою R0070. Може також використовуватися суміш молочнокислих бактерій з біфідобактеріями.

*Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446, необов'язково разом з вищеописаною сумішшю олігосахаридів, переважно вводиться дитині відразу після пологів і протягом, принаймні, перших двох місяців життя дитини. Більш переважно вказане введення триває до досягнення дитиною 6-місячного віку.

*Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 можливо вводити безпосередньо дитині, або вигодовувана грудьми дитина може отримувати вказаний пробіотик з молоком матері. Якщо дитина повинна отримувати пробіотик з молоком матері, то в цьому випадку пробіотик може бути добавкою у формі, наприклад, пігулок, капсул, пастил, жувальної гумки або рідини. Добавка переважно містить вищеописану суміш олігосахаридів в кількості від 0,2 до 10 г/день. Добавка може додатково містити захисні гідроколлоїди (такі як камідь, білки, модифіковані крохмалі), зв'язуючі агенти, плівкоутворюючі агенти, інкапсулюючі агенти/матеріали, матеріали стінки/оболонки, матриксні з'єднання, оболонки, емульгатори, поверхнево-активні агенти, солюбілізуючі агенти (масла, жири, віск, лецитини тощо), адсорбенти, носії, наповнювачі, со-з'єднання, диспергуючі агенти, зволожуючі агенти, засоби обробки (розчинники), агенти для

текучості, агенти для маскування смаку, агенти маси, желюючі агенти, желеутворюючі агенти, антиоксиданти і антимікробні агенти. Додаток може також містити звичайні фармацевтичні добавки і ад'юванти, наповнювачі і розріджувачі, включаючи без обмеження воду, желатин будь-якого походження, рослинну камідь, лігнінсульфонат, тальк, цукор, крохмаль, гуміарабік, рослинні олії, поліалкіленгліколі, смакоароматичні добавки, консерванти, стабілізатори, емульгатори, буферні речовини, змащуючі агенти, фарбники, зволожуючі агенти, ущільнювачі, і тому подібне. У всіх випадках такі додаткові компоненти вибирають по відношенню до їх придатності для призначеного прийому.

Альтернативно *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 можливо вводити матері у формі лікувальної харчової композиції. Композиція може бути повноцінною харчовою сумішшю.

Повноцінна харчова суміш для застосування у годуючої жінки відповідно до винаходу може включати джерело білка. Може застосовуватися будь-який придатний дієтичний білок, наприклад, тваринні білки (такі як молочні білки, м'ясні білки і яєчні білки); рослинні білки (такі як соєвий білок, пшеничний білок, рисовий білок, і гороховий білок); суміші вільних амінокислот, або їх комбінації. Особливо переважними є молочні білки, такі як казеїн і сироватка, і білки сої. Композиція може також містити джерело вуглеводів і джерело жиру.

Якщо рецептура суміші включає джерело жиру на додаток до докозагексаєнової кислоти, джерело жиру переважно забезпечує від 5 % до 40 % калорійності суміші; наприклад, від 20 % до 30 % калорійності. Відповідний профіль жирів може бути отриманий із застосуванням суміші олії каноли, кукурудзяної олії і олії соняшнику з високим вмістом олеїнової кислоти.

У рецептуру суміші можна додати джерело вуглеводів. Воно переважно забезпечує від 40 % до 80 % енергії суміші. Можна застосовувати будь-яке відповідне джерело вуглеводів, наприклад, сахарозу, лактозу, глюкозу, фруктозу, тверді речовини кукурудзяного сиропу, мальтодекстрини і їх суміші. При необхідності можна також додати харчові волокна. Харчові волокна проходять крізь тонкий кишківник, не перетравлюючись ферментами, і функціонують як природний наповнювач і проносне. Харчові волокна можуть бути розчинними або нерозчинними, і загалом переважною є суміш двох типів. Відповідні джерела харчових волокон включають сою, горох, овес, пектин, гуарову камедь, гуміарабік, фрукто-олігосахариди, галакто-олігосахариди. Переважно, якщо волокна присутні, вміст волокон становить між 2 і 40 г/л споживаної суміші, переважніше між 4 і 10 г/л. На додаток до цього, композиція переважно містить також вищеописану суміш олігосахаридів в кількості від 0,2 до 5 г/л відновленої композиції, переважніше - від 1 до 2 г/л.

Рецептура суміші може також містити мінерали і мікронутрієнти, такі як мікроелементи і вітаміни відповідно до рекомендацій урядових органів, таких як USRDA (у США). Наприклад, суміш може містити на добову дозу один або більш з наступних мікронутрієнтів в наступних діапазонах: від 300 до 500 міліграмів кальцію, від 50 до 100 міліграмів магнію, від 150 до 250 міліграмів фосфору, від 5 до 20 міліграмів заліза, від 1 до 7 міліграмів цинку, від 0,1 до 0,3 міліграмів міді, від 50 до 200 мкг йоду, від 5 до 15 мкг селену, від 1000 до 3000 мкг бета-каротину, від 10 до 80 міліграмів вітаміну С, від 1 до 2 міліграмів вітаміну В1, від 0,5 до 1,5 міліграмів вітаміну В6, від 0,5 до 2 міліграмів вітаміну В2, від 5 до 18 міліграмів ніацину, від 0,5 до 2,0 мкг вітаміну В12, від 100 до 800 мкг фолієвої кислоти, від 30 до 70 мкг біотину, від 1 до 5 мкг вітаміну D, від 3 до 10 МЕ вітаміну Е.

При необхідності в суміш можна включити один або більш харчових емульгаторів, наприклад, ефіри диацетилвиннокам'яної кислоти і моно- і дигліцеридів, лецитин і моно- і дигліцериди. Можуть бути включені відповідні придатні солі і стабілізатори.

Суміш переважно застосовують ентерально, наприклад, у формі порошку для відновлення з молоком або водою.

Альтернативно, або дітям, що не знаходяться на грудному вигодовуванні, пробіотик можна вводити у вигляді добавки, наприклад, у вигляді щоденної дози  $10^{10}$  КУО, розчиненої у воді, що надається в ложці.

Для дітей, що не знаходяться на грудному вигодовуванні, пробіотичні бактерії можна просто застосовувати в дитячій суміші.

Суміш для дитячого харчування в рамках застосування згідно даного винаходу може містити джерело білка в кількості не більше 2,0 г/100 ккал, переважно - від 1,8 до 2,0 г/100 ккал. Вид білка не є критичним в даному винаході за умови, що він відповідає мінімальним вимогам до вмісту основних амінокислот і забезпечує задовільне зростання, хоча краще, щоб понад 50 мас. % джерела білка складала молочна сироватка. Так, можуть застосовуватися джерела білка на основі сироватки, казеїну і їх сумішей, а також джерела білка на основі сої. Що стосується сироваткових білків, то джерело білка може бути на основі кислої сироватки або

солодкої сироватки, або їх сумішей, і може включати альфа-лактальбумін і бета-лактоглобулін в будь-яких необхідних співвідношеннях.

Білки можуть бути інтактними або гідролізованими або сумішшю інтактних і гідролізованих білків. Бажаним є використання частково гідролізованих білків (ступінь гідролізу між 2 % і 20 %), наприклад, для грудних дітей з передбачуваним ризиком розвитку алергії на коров'яче молоко. Якщо потрібні гідролізовані білки, то процес гідролізу може здійснюватися будь-яким прийнятним методом, відомим з рівня техніки. Наприклад, сироватково-білковий гідролізат може бути отриманий ферментативним гідролізом сироваткової фракції, із однією або декількома стадіями. Встановлено, що, якщо як початковий матеріал використовується сироваткова фракція, що практично не містить лактози, то білок в процесі гідролізу набагато менше зазнає лізинової блокади. Це дозволяє понизити ступінь лізинової блокади приблизно з 15 мас. % загального лізину до менше 10 мас. % лізину, наприклад, приблизно до 7 мас. % лізину, що значно покращує поживні властивості джерела білка.

Дитяча суміш може містити джерело вуглеводів. Можна застосовувати джерело вуглеводів, що зазвичай міститься в дитячій суміші, таке як лактоза, сахароза, мальтодекстрин, крохмаль і їх суміші, хоча переважним джерелом вуглеводів є лактоза. Переважно джерела вуглеводів становлять між 35 і 65 % від загальної енергії суміші.

Дитяча суміш може містити джерело ліпідів. Джерело ліпідів може бути будь-яким ліпідом або жиром, придатним для застосування в дитячих сумішах. Переважно, джерела жиру включають пальмовий олеїн, соняшникові олії з високим вмістом олеїнів, і сафлорову олію з високим вмістом олеїнів. Також можуть бути додані основні жирні кислоти - лінолієва і  $\alpha$ -ліноленова кислота у вигляді малих кількостей олій, що містять високі кількості заздалегідь освітленої арахідонової кислоти і докозагексанової кислоти, таких як риб'ячий жир і мікробні олії. Загалом вміст жиру переважно є таким, що становить від 30 до 55 % енергії від загальної калорійності суміші. Джерело жиру переважно має відношення n-6 до n-3 жирних кислот від приблизно 5:1 до приблизно 15:1; наприклад, від приблизно 8:1 до приблизно 10:1.

Дитяча суміш може також містити всі вітаміни і мінерали, що вважаються незамінними в добовій дієті і в харчово значимих кількостях. Для певних вітамінів і мінералів встановлені мінімальні вимоги. Приклади мінералів, вітамінів і інших нутрієнтів, необов'язково присутніх в дитячій суміші, включають вітамін А, вітамін В1, вітамін В2, вітамін В6, вітамін В12, вітамін Е, вітамін К, вітамін С, вітамін D, фолієву кислоту, інозитол, ніацин, біотин, пантотенову кислоту, холін, кальцій, фосфор, йод, залізо, магній, мідь, цинк, марганець, хлорид, калій, натрій, селен, хром, молібден, таурин і L-карнітин. Мінерали зазвичай додають у формі солей. Присутність і кількості специфічних мінералів і інших вітамінів вар'юються залежно від визначеної популяції грудних дітей.

При необхідності дитяча суміш може містити емульгатори і стабілізатори, такі як соєвий лецитин, ефіри лимонної кислоти і моно- і дигліцеридів, і тому подібне.

Переважно дитяча суміш містить вищеописану суміш олігосахаридів в кількості від 0,2 до 5 г/л відновленої суміші, переважно від 1 до 2 г/л.

Дитяча суміш може необов'язково містити інші речовини, які можуть мати сприятливий ефект, такі як волокна, лактоферрин, нуклеотиди, нуклеозиди, і тому подібне.

Як дитяча, так і харчова суміші, описані вище, можуть бути приготовані в будь-якій відповідній спосіб. Наприклад, вони можуть бути приготовані шляхом змішування разом з білком, джерелом вуглеводів і джерелом жиру в належних пропорціях. На даній стадії можуть бути включені емульгатори, якщо вони застосовуються. На даній стадії можуть бути додані вітаміни і мінерали, але їх зазвичай додають пізніше, щоб уникнути термічної деградації. Будь-які ліпофільні вітаміни, емульгатори і тому подібне можуть бути розчинені в джерелі жиру перед змішуванням. Потім можна змішати воду, переважно воду, піддану зворотному осмосу, до утворення рідкої суміші. Температура води складає переважно від приблизно 50 °C до приблизно 80 °C для досягнення дисперсії інгредієнтів. Можуть застосовуватися комерційно доступні розріджувачі для утворення рідкої суміші. Рідку суміш потім гомогенізують, наприклад, в дві стадії.

Рідку суміш можливо потім піддати термічній обробці для зниження бактерійного навантаження шляхом швидкого нагрівання рідкої суміші до температури в діапазоні від приблизно 80 °C до приблизно 150 °C протягом, наприклад, від приблизно 5 секунд до приблизно 5 хвилин. Це можна здійснити за допомогою введення пари, автоклаву або теплообмінника; наприклад, пластинчастого теплообмінника.

Потім рідку суміш можна охолодити до температури приблизно від 60 °C до приблизно 85 °C; наприклад, шляхом миттєвого охолодження. Рідку суміш потім можна знов гомогенізувати; наприклад, в дві стадії, при приблизно 10 МПа - до 30 МПа на першій стадії, і від



приблизно 2 МПа до приблизно 10 МПа на другій стадії. Суміш, що гомогенізують, можна потім додатково охолодити для додавання будь-яких чутливих до нагрівання компонентів, таких як вітаміни і мінерали. На цій стадії зручно регулюють рН і вміст твердих речовин.

5 Суміш, що гомогенізують, переносять у відповідний апарат для висушування, такий як сушарка-розпилювач або ліофілізатор, і перетворюють на порошок. Порошок повинен мати вміст води менш ніж приблизно 5 % по масі.

10 Bifidobacterium lactis CNCM I-3446 можуть бути культивовані відповідно до будь-якого відповідного способу, і підготовлені для додавання в харчову або дитячу суміш, наприклад, за допомогою ліофілізації або сушарки-розпилювача. Альтернативно, Bifidobacterium lactis CNCM I-3446 можна купити у Christian Hansen під торговою маркою Bb12® вже приготованими у формі, придатній для додавання в продукти харчування, такі як харчова і дитяча суміш. Bifidobacterium lactis CNCM I-3446 може додаватися в суміш в кількості від  $10^3$  до  $10^{12}$  КУО/г порошку, переважно - від  $10^7$  до  $10^{12}$  КУО/г порошку.

Нижче винахід ілюструється наступними прикладами.

15 Приклад 1

Приклад складу суміші для дитячого харчування, придатної для застосування відповідно до даного винаходу, надається нижче.

| Нутрієнт                             | На 100 ккал   | На літр |
|--------------------------------------|---|---------|
| Енергія (ккал)                       | 100   | 670     |
| Білок (г)                            | 1,83  | 12,3    |
| Жир (г)                              | 5,3   | 35,7    |
| Лінолієва кислота (г)                | 0,79  | 5,3     |
| $\alpha$ -ліноленова кислота (мг)    | 101   | 675     |
| Лактоза (г)                          | 11,2  | 74,7    |
| Мінерали (г)                         | 0,37  | 2,5     |
| Na (мг)                              | 23  | 150     |
| K (мг)                               | 89  | 590     |
| Cl (мг)                              | 64  | 430     |
| Ca (мг)                              | 62  | 410     |
| P (мг)                               | 31  | 210     |
| Mg (мг)                              | 7   | 50      |
| Mn (мкг)                             | 8   | 50      |
| Se (мкг)                             | 2   | 13      |
| Вітамін А (мкг RE (ретинолу))        | 105   | 700     |
| Вітамін D (мкг)                      | 1,5   | 10      |
| Вітамін Е (міліграм ТЕ (токоферола)) | 0,8   | 5,4     |
| Вітамін К1 (мкг)                     | 8   | 54      |
| Вітамін С (міліграм)                 | 10  | 67      |
| Вітамін В1 (міліграм)                | 0,07  | 0,47    |
| Вітамін В2 (міліграм)                | 0,15  | 1       |
| Ніацин (міліграм)                    | 1   | 6,7     |
| Вітамін В6 (міліграм)                | 0,075   | 0,5     |
| Фолієва кислота (мкг)                | 9   | 60      |
| Пантотенова кислота (міліграм)       | 0,45  | 3       |
| Вітамін В12 (мкг)                    | 0,3   | 2       |
| Біотин (мкг)                         | 2,2   | 15      |
| Холін (мг)                           | 10  | 67      |
| Fe (мг)                              | 1,2   | 8       |
| I (мкг)                              | 15  | 100     |
| Cu (мг)                              | 0,06  | 0,4     |
| Zn (мг)                              | 0,75  | 5       |
| Bifidobacterium lactis CNCM I-3446   | $2 \times 10^7$ КУО/г порошку, життєздатні бактерії |         |

20 Приклад 2

В даному прикладі порівнюють ефект Bifidobacterium lactis CNCM 1-3446 з додаванням і без додавання олігосахаридного інгредієнта, що включає N-ацетильовані олігосахариди, нейтральні олігосахариди і сіалійовані олігосахариди (далі по тексту CMOS-GOS), на встановлення початкової біфідогенної кишкової мікробіоти у експериментального зразку гнотобіологічної миші

для вивчення пологів з допомогою кесарева розтину, із ефектом іншого штаму біфідобактерій і контрольним зразком. Вказаний зразок є відповідним відтворенням на тварині дитини, народженої шляхом кесарева розтину, що має субоптимальну кишкову мікробіоту в межах популяції біфідобактерій. На додаток до спостереження за величиною популяції біфідобактерій, вказаний зразок придатний також для вивчення позитивного ефекту біфідобактерій як бар'єру проти потенційно патогенних бактерій типу *Clostridium perfringens*.

#### Матеріали і методи

Стерильні миші C3H - самки і самці - були придбані у Charles River Laboratories (Франція) і перевезені в транспортних ізоляторах в Nestle Research Centre. Після прибуття тварини були пересаджені в ізолятори для розведення після контролю їх стану стерильності. Для проведення даного дослідження використовувалося потомство від самок цієї відібраної для розведення популяції. Після відняття від батьків, тварини довільно розподілялися по 4 експериментальних групах: у групі А тварини отримували контрольний раціон і контрольне пиття; у В - контрольний раціон і пиття з пробіотиком *B. lactis* CNCM I-3446; у С - раціон з пребіотиком CMOS-GOS і питтям з пробіотиком *B. lactis* CNCM I-3446; у D - контрольний раціон і пиття з пробіотиком *B. longum* ATCC BAA-999.

Тварини містилися в різних ізоляторах в клітках по 5 тварин на кожну клітку. Група А містилася в одному ізоляторі, групи В і С - в другому, а група D - в третьому ізоляторі. Стан стерильності контролювався щотижня шляхом аналізу свіжозібраних фекалій від однієї тварини з кожної клітки. Протягом цього періоду тваринам згодовувався основний раціон AIN-93 (див. нижче табл.1).

Після досягнення тваринами віку від 7 до 8 тижнів проводився повторний контроль стану стерильності на 2 тваринах з кожної клітки, після чого кожній тварині примусово вводилася через зонд одинична доза (200 мкл) суміші мікробіоти немовляти (HBF), описаної нижче в табл.2. Після введення вказаної суміші всі тварини знаходилися на основному раціоні протягом 2 тижнів, необхідних для становлення HBF в кишківнику. Потім твердий раціон був замінений сумішшю AIN (табл.1) (у групах А, В і D) або сумішшю AIN-CMOS-GOS (у групі С). Звичайна питна вода була замінена сольовим водним розчином, що містить 0,5 % (о./об.) MRS (середовище, назване по початкових буквах прізвищ її творців: de Man-Rogosa-Sharpe) (в групі А), або сольовим водним розчином, що містить пробіотичні бактерії і 0,5 % (о./об.) MRS (у групах В, С і D). Остаточні концентрації пробіотиків склали  $2,5 \times 10^7$  КУО/мл *B. lactis* CNCM I-3446 (в групах В і С) and  $2,2 \times 10^7$  КУО/мл *B. longum* ATCC BAA-999 (в групі D).

*Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 був отриманий з колекції культур Nestle. Якщо говорити стисло, то штам реактивувався і вирощувався в MRS середовищі приблизно до  $1,5 \times 10^9$  КУО/мл. Після цього штам концентрували центрифугуванням у тому самому MRS середовищі і розбавляли до  $4,9 \times 10^9$  КУО/мл свіжоприготованим MRS середовищем. Потім штам розділяли на аліквоти по 1 мл, які заморожувалися при  $-80^\circ\text{C}$  до подальшого застосування. Щодня одну свіжорозморожену аліквоту по 1 мл. *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 в MRS середовищі (для груп В і С) або 1 мл MRS (для групи А) середовища вводили в ізолятори, розчиняли в 200 мл сольового розчину і порівну розподіляли по питних пляшках. При середньому споживанні 5 мл/доба/миша кожна тварина з груп, в раціон яких входили *B. lactis*, отримувала біля  $10^8$  КУО *B. lactis*/доба.

*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 був отриманий з колекції культур Nestle. Якщо говорити стисло, то штам реактивувався і вирощувався в MRS середовищі приблизно до  $1 \times 10^9$  КУО/мл. Після цього штам концентрували центрифугуванням і розбавляли до  $4,4 \times 10^9$  КУО/мл свіжоприготованого MRS середовища. Потім розділяли на аліквоти по 1 мл, які заморожували при  $-80^\circ\text{C}$  до подальшого застосування. Щодня одну свіжорозморожену аліквоту по 1 мл. *Bifidobacterium longum* ATCC BAA999 в MRS середовищі (для групи D) вводили в ізолятори, розчиняли в 200 мл сольового розчину і порівну розподіляли по питних пляшках. При середньому споживанні 5 мл/доба/миша кожна тварина з групи, в раціон якої входили *B. longum*, отримувала біля  $10^8$  КУО *B. longum*/доба.

Олігосахаридний інгредієнт CMOS-GOS готувався з депротеїнізованого і демінералізованого пермеату молочної сироватки, наявної в промисловості (Lactoserum France, Франція). Якщо говорити стисло, то отриманий шляхом ультрафільтрації пермеат сироватки коров'ячого молока піддавався демінералізації на промисловій лінії демінералізації, обладнаній електродіалізними модулями і аніонно- і катіоннообмінниками (Lactoserum France). Потім демінералізований сироватковий пермеат піддавали 2 послідовним промисловим циклам кристалізації лактози і подальшій сушці в сушарці-розпилювачі (Lactoserum France). Отриманий порошок модифікованого первинного розчину гідратували в атмосфері з підвищеною відносною вологістю (~43 %), встановленою за допомогою насиченого розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , у закритому

контейнері. Це сприяло утворенню кристалічної лактози. До повторно гідратованого порошку додавали холодну воду (приблизно 2-3 літри/кг регідратованого порошку), і суміш центрифугували при 10 000/г протягом 20 хвилин. Супернатант збирали, а осад піддавали повторному суспензуванню в холодній воді і повторно центрифугували. Другий супернатант поєднували з першим, і обидва піддавали ліофілізації. Отриманий олігосахаридний інгредієнт коров'ячого молока з пониженим вмістом лактози (CMOS) піддавали аналізу у високоточній системі аніоннообмінної хроматографії, обладнаної імпульсним амперометричним детектором (HPLC-PAD; ICS3000, Dionex, Sunnyvale, CA), із застосуванням аналітичної колонії CarboPac PA200 (Dionex), обладнаної попереднім аміновловлювачем CarboPac (Dionex). Препарат CMOS містив оригінальні олігосахариди і близько 3 % (мас/мас.) глюкози, 46 % (мас/мас.) лактози, 0,84 % (мас/мас.) сіаліл-лактози. Галактозиліолігосахариди (Vivinal GOS 259) були придбані у Friesland Foods DOMO. Інгредієнт реалізується у вигляді сиропу із вмістом сухої речовини (DM) близько 75 %, з яких лактоза складає 23 % (у перерахунку на DM), глюкоза - 22 % (у перерахунку на DM), галактозиліолігосахариди - 59 % (у перерахунку на DM); він змішувався з препаратом CMOS з отриманням інгредієнта CMOS-GOS, що містить близько 9 % мас. N-ацетильованих олігосахаридів, приблизно 82 % мас. нейтральних олігосахаридів і близько 9 % мас. сіалійованих олігосахаридів.

Мишам згодовувався виключно напівсинтетичний раціон AIN-93 і його модифікації (табл.1). Починаючи з 15 дня після пологів, їм давали основний AIN-93 раціон. На початку експериментів мишачий молодняк після досягнення віку приблизно 8 тижнів отримував протягом 14 днів 'AIN-суміш' (групи A, B і D) або 'AIN-CMOS-GOS' (група C).

Таблица 1

Склад згодовуваних мишам AIN раціонів (г/100г раціону)

|                                      | AIN-93 основний | AIN суміш | AIN-CMOS-GOS |
|--------------------------------------|-----------------|-----------|--------------|
| Кукурудзяний крохмаль                | 51,5            | 49,8      | 21,5         |
| Целюлоза                             | 5               | 5         | 5            |
| Сахароза                             | 10              | 10        | 10           |
| Глюкоза                              | -               | 1,45      | 1,45         |
| Лактоза                              | -               | 12,3      | 12,3         |
| CMOS-GOS <sup>2)</sup>               | -               | -         | 2,3          |
| Казеїн                               | 20              | 20        | 20           |
| Соєва олія                           | 7               | 7         | 7            |
| Суміш мінералів AIN-93G              | 3,5             | 3,5       | 3,5          |
| Суміш вітамінів AIN-93 <sup>1)</sup> | 2,5             | 2,5       | 2,5          |
| Холін-дитартрат                      | 0,25            | 0,25      | 0,25         |
| L-цистин                             | 0,3             | 0,3       | 0,3          |
| Трет-бутилгідрокінон                 | 0,0014          | 0,0014    | 0,0014       |

<sup>1)</sup> Суміш вітамінів була доповнена вітаміном B1 (тіамін-HCl) в кількості 330 мг/кг суміші вітамінів з метою забезпечення необхідних рівнів 600 мг/кг.

<sup>2)</sup> Включає SL (сіаліл-лактозу) в кількості 0,2 г/100 г.

Таблица 2

Склад мікробіоти

| Штам  | Фенотип колоній на чашці | Введена концентрація log (КУО/мл) |
|---|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bifidobacterium breve</i> NCC452 (viv4)      | Білі, крупні             | 8,85                              |
| <i>Bifidobacterium longum</i> NCC572 (viv5)     | Сірі, невеликі           | 8,19                              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FSM124 (viv3)      |                          | 8,48                              |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> FSM115 (viv2) |                          | 8,48                              |
| <i>Escherichia coli</i> FSM325 (viv1)           |                          | 8,48                              |
| <i>Bacteroides distasonis</i> FSM24 (viv20)     |                          | 8,48                              |
| <i>Clostridium perfringens</i> FSM-C14 (viv19)  |                          | 6,0                               |

Контроль за станом стерильності здійснювався шляхом аналізу свіжозібраних фекалій від 1-2 мишей/на кожну клітку. Якщо говорити стисло, то одна частинка свіжозібраних фекалій гомогенізувалася в 0,5 мл розчину Рінгера (Oxoid, UK) з додаванням 0,05 % (мас/об.) L-цистеїна (HCl) і двічі висівалася по 100 мкл на 2 чашки TSS (агар з соєю Tgurscase з додаванням 5 % овечої крові; BioMerieux, France). Одна чашка інкубувалася в умовах аеробності протягом 24 годин при 37 °С, друга чашка -в анаеробних умовах протягом 48 годин при 37 °С.

Зразки фекалій збиралися і піддавалися аналізу, починаючи з 14 дня. Якщо говорити стисло, то одна частинка фекалій кожної миші гомогенізувалася в 0,5 мл розчину Рінгера (Oxoid, UK) з додаванням 0,05 % (мас/об.) L-цистеїна (HCl), і в різних розбавленнях бактерійного розчину висівалася на селективні і напівселективні середовища для підрахунку специфічних мікроорганізмів: біфідобактерій - на середовищі Eugon Tomato, лактобацил - на MRS-середовищі з додаванням антибіотиків (фосфоміцин, сульфаметоксазол і тріметопрім), *C. perfringens* - на NN-агаровому середовищі, ентеробактерій - на середовищі Drigalski і бактероїдів - на середовищі Shaedler Neo Vanco. Чашки інкубувалися при 37 °С в умовах аеробності протягом 24 годин для підрахунку ентеробактерій і в анаеробних умовах протягом 48 годин для підрахунку біфідобактерій, лактобацил, бактероїдів і *C. perfringens*.

На 14 добу тварини присиплялися. Якщо говорити стисло, то 2 клітки з кожного ізолятора одночасно виймалися з даного ізолятора при одночасній підтримці ізолятора в стерильному стані до видалення всіх тварин. Кожна тварина зважувалася. Відразу після зважування тварину вбивали шляхом знеголовлювання і повного знекровлення. Кров збирали, а тварин препарували з метою отримання зразків вмісту тонкої кишки (приблизно 6-7см відразу після дванадцятипалої кишки) для проведення аналізу мікробіоти.

#### Результати

Фіг.1 показує кількість двох резидентів мікробіоти немовляти - біфідобактерій *B. breve* і *B. longum* в тонкій кишці (jejunum) і фекаліях через два тижні лікування. У групах В і С відмічена підвищена кількість *B. breve* в тонкій кишці. У фекаліях підвищена кількість була виявлена в групах В і D. Не встановлено істотних відмінностей в кількості *B. longum* між групами.

Кількість *C. perfringens* в тонкій кишці (jejunum) і фекаліях через два тижні лікування показано на Фіг.2. У тонкій кишці знижені рівні *C. perfringens* counts виявлені в групах В і С, отримуючих *B. lactis*, але не в групах А і D, не отримуючих *B. lactis*. Цей ефект був навіть більш вираженим в зразках фекалій.

Рівні *B. lactis*, вище порогового ( $10^5$  КУО/г фекалій), були виявлені приблизно у 50 % тварин в групах В і С через 1 тиждень і у жодної тварини через 2 тижні. Як можна бачити з табл. 3 (нижче), не дивлячись на відносно високу добову дозу *B. lactis*, що вводилися, останні не могли конкурувати з резидентом мікробіоти - біфідобактеріями - і залишалися міноритарним компонентом мікробіоти.

Таблиця 3

Кількість *B. lactis* у фекаліях і у вмісті тонкої кишки в ході експерименту

| Група | >10 <sup>5</sup> КУО/г фекалій |           | >10 <sup>2</sup> КУО/г вмісту тонкої кишки |
|-------|--------------------------------|-----------|--|
|       | Тиждень 1                      | Тиждень 2 | Тиждень 2 (тонка кишка)                    |
| В     | 5/9                            | 0/9       | 3/9  |
| С     | 3/9                            | 0/9       | 6/9  |

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції як стимулятора розвитку початкової біфідогенної кишкової мікробіоти у дітей, народжених шляхом кесарева розтину.

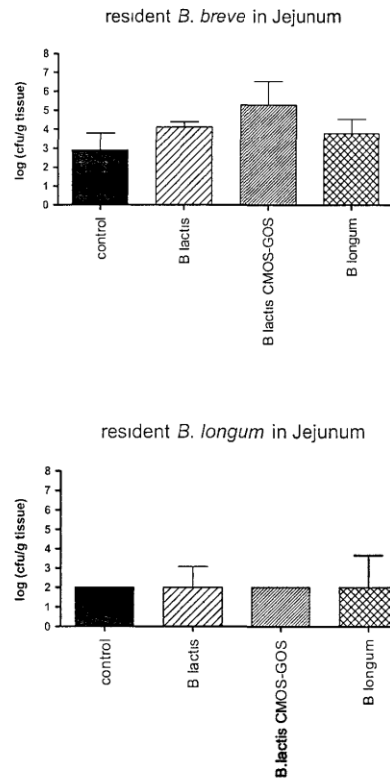
2. Застосування *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції як засобу для зниження ризику подальшого розвитку алергії у дітей, народжених шляхом кесарева розтину.

3. Застосування *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 у виробництві лікарського засобу або лікувальної харчової композиції як засобу для попередження або лікування діареї у дітей, народжених шляхом кесарева розтину.

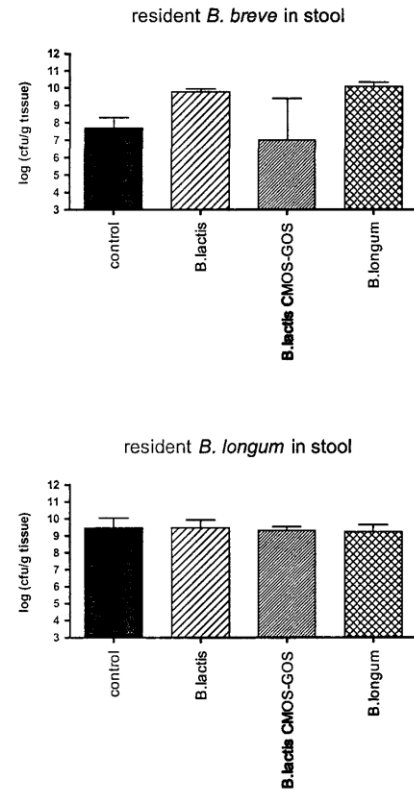
4. Застосування по будь-якому з попередніх пунктів 1-3, в якому лікарський засіб або лікувальна харчова композиція включає також суміш олігосахаридів, що містить від 5 % до 70 мас. % принаймні одного N-ацетильованого олігосахариду, вибраного з групи, що включає

- GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc і Gal $\beta$ 1,6GalNAc $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; від 20 % до 90 мас. % принаймні одного нейтрального олігосахариду, вибраного з групи, що включає Gal $\beta$ 1,6Gal, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc і Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc, і від 5% до 50 мас. % принаймні одного сіалійованого олігосахариду, вибраного з групи, що включає NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc і NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc.
5. Застосування за пунктом 4, в якому суміш олігосахаридів містить від 10 % до 70 мас. % N-ацетильованих олігосахаридів, від 20 % до 80 мас. % нейтральних олігосахаридів і від 10 % до 50 мас. % сіалійованих олігосахаридів.
10. 6. Застосування за пунктом 4 або 5, в якому суміш олігосахаридів містить від 15 % до 40 мас. % N-ацетильованих олігосахаридів, від 40 % до 60 мас. % нейтральних олігосахаридів і від 15 % до 30 мас. % сіалійованих олігосахаридів.
7. Застосування за пунктом 4 або 5, в якому суміш олігосахаридів містить від 5 % до 20 мас. % N-ацетильованих олігосахаридів, від 60 % до 90 мас. % нейтральних олігосахаридів і від 5 % до 30 мас. % сіалійованих олігосахаридів.
15. 8. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, в якому лікарський засіб або лікувальна харчова композиція вводиться дитині відразу після пологів і протягом подальших принаймні 2 місяців.
9. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, в якому лікарський засіб або лікувальна харчова композиція вводиться дитині протягом принаймні 6 місяців після пологів.
20. 10. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, в якому *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446 надходить в організм дитини, що знаходиться на грудному вигодовуванні, разом з молоком матері.
11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів 1-9, в якому лікувальна харчова композиція є сумішшю для дитячого харчування.
25. 12. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, в якому лікарський засіб містить від  $10^5$  до  $10^{11}$  КУО *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446/ добова доза.
13. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів 1-11, в якому лікувальна харчова композиція містить від  $10^3$  до  $10^{12}$  КУО *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446/грам композиції (у перерахунку на суху масу).
- 30.

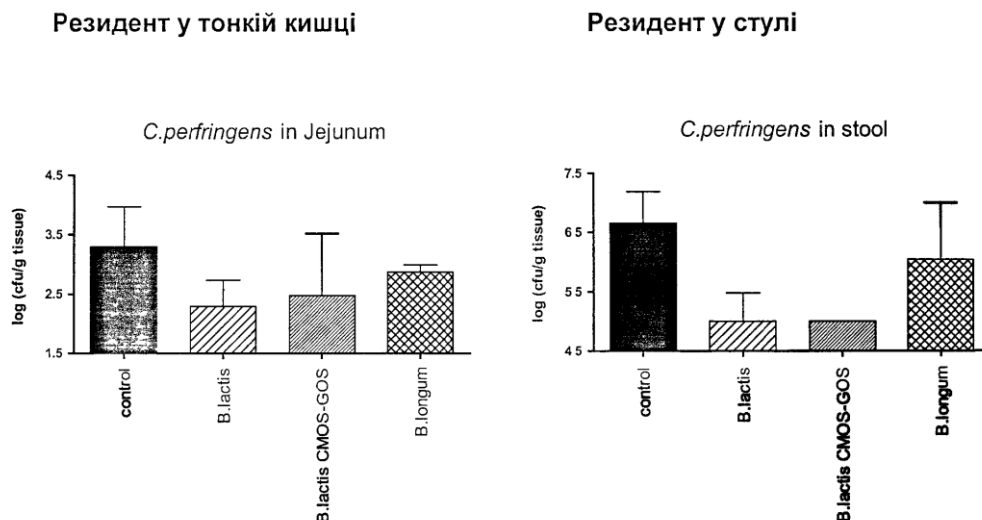
## Резидент у тонкій кишці



## Резидент у стулі



**Фігура 1.** Кількості *B. breve* і *B. longum* у зразках фекалій і вмісту тонкої кишки миші на 14 день експерименту. Ліміт визначення становив  $10^5$  КУО/г фекалій і  $10^2$  КУО/г вмісту тонкої кишки. Середні значення представлені міжквартильних межах у контрольній групі (повністю забарвлені стовпці), групі з пробіотиком *B. lactis* (заштриховані стовпці), групі з пребіотиком CMOS-GOS + пробіотик *B. lactis* (стовпці, заштриховані тонкими лініями) і групі із пробіотиком *B. longum* (перехресно заштриховані стовпці). (N = 9 -10).



**Фігура 2.** Кількості *C. perfringens* у зразках фекалій і вмісту тонкої кишки миші на 14 день експерименту. Ліміт визначення становив  $10^5$  КУО/г фекалій і  $10^2$  КУО/г вмісту тонкої кишки. Середні значення представлені міжквартильних межах у контрольній групі (повністю забарвлені стовпці), групі з пробіотиком *B. lactis* (заштриховані стовпці), групі з пребіотиком CMOS-GOS + пробіотик *B. lactis* (стовпці, заштриховані тонкими лініями) і групі із пробіотиком *B. longum* (перехресно заштриховані стовпці). (N = 9 -10).